



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI MILANO

Effetto di digeriti gastrointestinali di Grana Padano e Trentingrana sulla mineralizzazione ossea *in vitro*

Ivano De Noni

Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente – DeFENS, Milano
ivano.denoni@unimi.it

Paola De Luca, Milda Stuknytė, Stefano Cattaneo, Filippo Rossi, Anita Ferraretto



Il Calcio, perché?

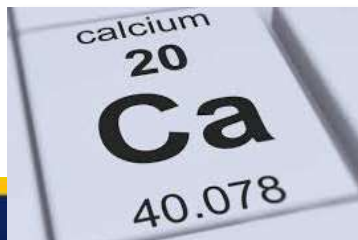
- ✓ Assunzione giornaliera raccomandata: 700–1300 mg in relazione a età, sesso, gravidanza, allattamento
- ✓ Nel mondo, circa 200 milioni di persone affette da osteoporosi (75 milioni in Europa, USA e Giappone)
- ✓ Ogni anno, più di 9 milioni di fratture da osteoporosi



Calcio, latte e formaggi

Dove?

- ✓ Latte vaccino: 120 mg / 100 mL
- ✓ Latte e derivati rappresentano la più importante fonte alimentare di Calcio...
- ✓ ...formaggi in particolare



Formaggio	Ca (mg / 100 g)
Freschi	160 – 210
A breve maturazione	512 – 567
Erborinati	400 – 405
Semi-duri	860 – 870
Duri	720 – 1169

Prodotti arricchiti in Calcio

Milk calcium powders

Sono tra i prodotti utilizzati per incrementare il contenuto di Calcio in alimenti e bevande

- ✓ Cereali prima colazione
- ✓ Succhi, **latte**, yogurt
- ✓ Integratori alimentari



Caseino Fosfopeptidi (CPP)

Mineral
(Ca²⁺)
carriers



Derivano da
 α_{S1} , α_{S2} e β
caseine

Serine
fosforilate

SerP-SerP-SerP-Glu-Glu

α_{S1} -CN f(66-70)

α_{S2} -CN f(8-12)

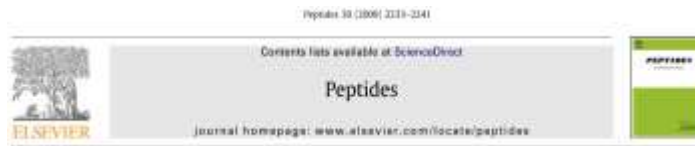
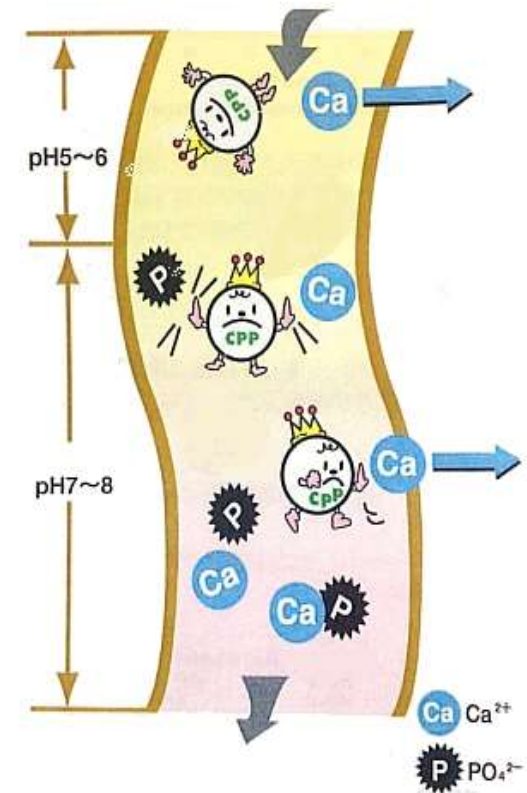
α_{S2} -CN f(56-60)

β -CN f(17-21)



Proprietà bioattive dei CPP

- Aumentano biodisponibilità del Ca
 - Prevengono precipitazione del Ca^{2+}
- Ca-CPP → Promuovono uptake di Ca *in vitro* in modelli di epitelio intestinale umano
 - Canali TRPV6 e L-type
- Ca-CPP → Stimolano uptake di Ca e la mineralizzazione *in vitro* di osteoblasti



Casein phosphopeptides promote calcium uptake and modulate the differentiation pathway in human primary osteoblast-like cells

Bianca Maria Donida^a, Emanuela Mrak^b, Claudia Gravaghi^c, Isabella Villa^b, Stefania Cosentino^a, Elena Zacchi^b, Silvia Perego^a, Alessandro Rubinacci^b, Amelia Fiorilli^a, Guido Tettamanti^{a,d}, Anita Ferraretto^{a*}

Grana Padano e Trentingrana



- **Calcio:** ~1 g/100 g
- Ricchi in **CPP**, rilasciati durante:
 - maturazione
 - digestione gastrointestinale
 - CPP ritrovati nel tratto gastrointestinale e nel sangue dopo ingestione di formaggi o caseine

Obiettivi



I digeriti di GP e TN mantengono le proprietà bioattive evidenziate *in vitro* dai CPP purificati?

Valutare l'effetto dei digeriti *in vitro* di GP e TN nel favorire:

- l'uptake di Ca
- la formazione della matrice minerale ossea

in colture cellulari *in vitro* come modelli di epitelio intestinale e di tessuto osseo umani



Premessa

- Formaggio: Ca^{2+} – CPPs



Digestione gastrointestinale

- Digestato: Ca^{2+} – CPPs

Trasporto transepiteliale

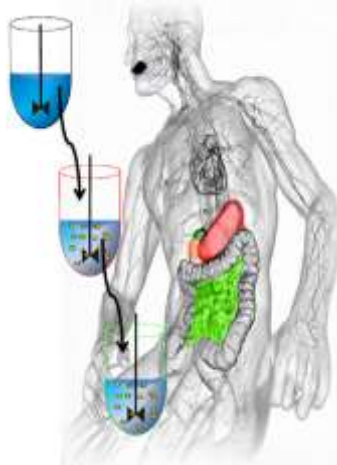
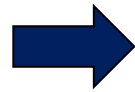
- Epitelio intestinale

Trasporto

- Matrice ossea



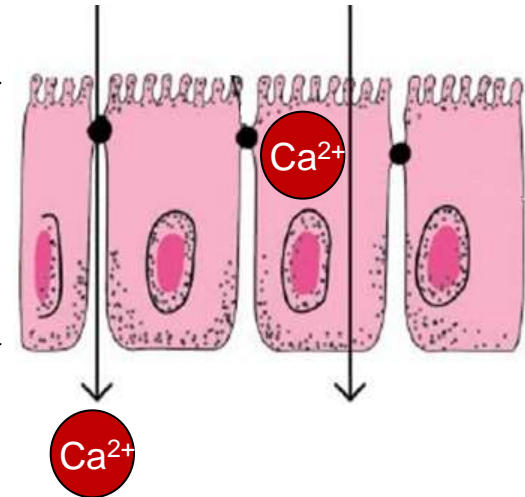
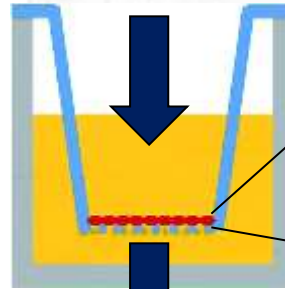
Disegno sperimentale



Qual Quant



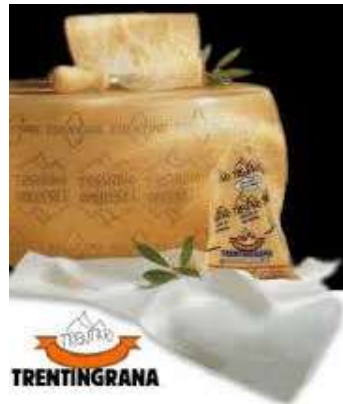
Uptake di Ca
in vitro in modello di
epitelio intestinale umano



Mineralizzazione ossea
in vitro in modello di tessuto
osseo umano



Digestione gastrointestinale statica *in vitro*



13, 19 e 26 mesi di maturazione

Fase orale

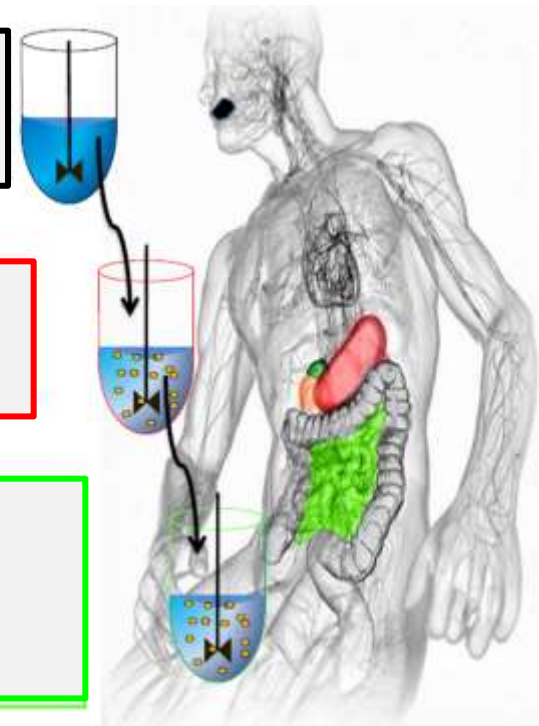
- Amilasi salivare
- 2 min, pH 7.1

Fase gastrica

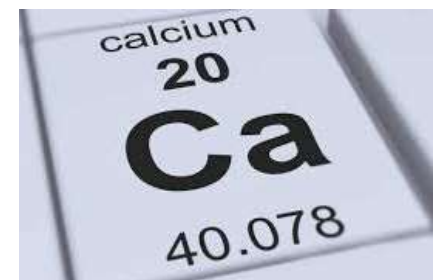
- Pepsina
- 2 h, pH 2

Fase intestinale

- Pancreatina
- Sali biliari
- 2 h, pH 7



Contenuto in Calcio



	Maturazione (mesi)	Ca (g/100 g)	
		formaggio	digerito
Grana Padano	13	0.89	0.55
	19	1.00	0.62
	26	0.84	0.52
Trentingrana	13	0.82	0.55
	19	0.84	0.52
	26	0.91	0.48

CPP nei digeriti di GP e TN

	Maturazione (mesi)	α_{S1} -CN	α_{S2} -CN	β -CN
GP	13	165 (sssEE-2)	79 (sssEE-4)	95 (sssEE-9)
	19	170 (sssEE-2)	55 (sssEE-4)	87 (sssEE-9)
	26	144 (sssEE-2)	67 (sssEE-6)	72 (sssEE-10)
TN	13	130 (sssEE-1)	78 (sssEE-2)	87 (sssEE-7)
	19	134 (sssEE-1)	64 (sssEE-5)	78 (sssEE-10)
	26	145 (sssEE-2)	59 (sssEE-4)	73 (sssEE-12)

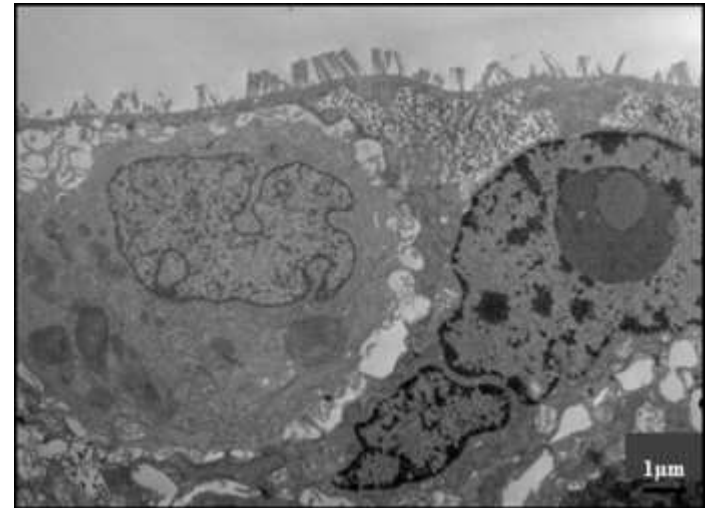
339
↓
18
sssEE



Assorbimento intestinale *in vitro* co-coltura Caco2/HT-29 (70%/30%)

Sesto giorno post-confluenza:

- co-presenza morfologica e fisiologica di entrambi i fenotipi enterici:
 - **assorbenti**
 - **secernenti**
- Valori di “transepithelial electrical resistance” (TEER):
 - stabili
 - simili a quelli propri delle cellule dell'intestino tenue umano *in vivo*



Individuazione della dose non citotossica di digerito

valutazione della vitalità cellulare e dell'integrità delle tight junction

Digestato di GP o TN

- 50 μL – 150 μL – 300 μL



100 μL – 200 μL

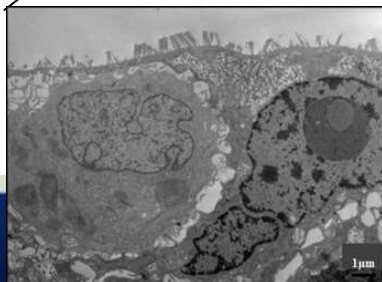
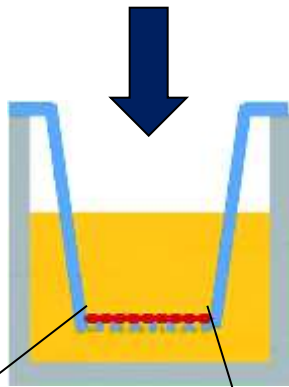
176–199 $\mu\text{M Ca}^{2+}$ 352–398 $\mu\text{M Ca}^{2+}$



- 2 h – 24 h

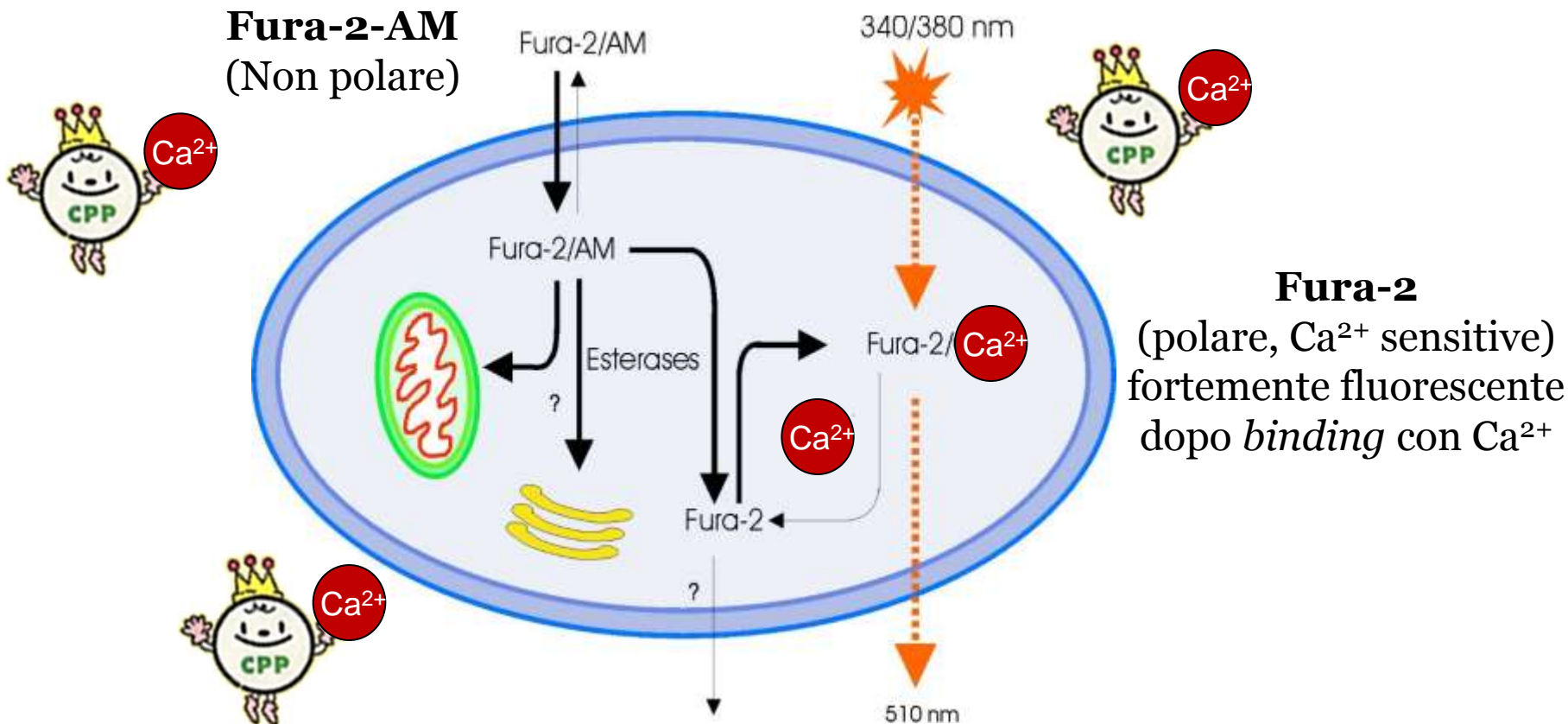


2 h

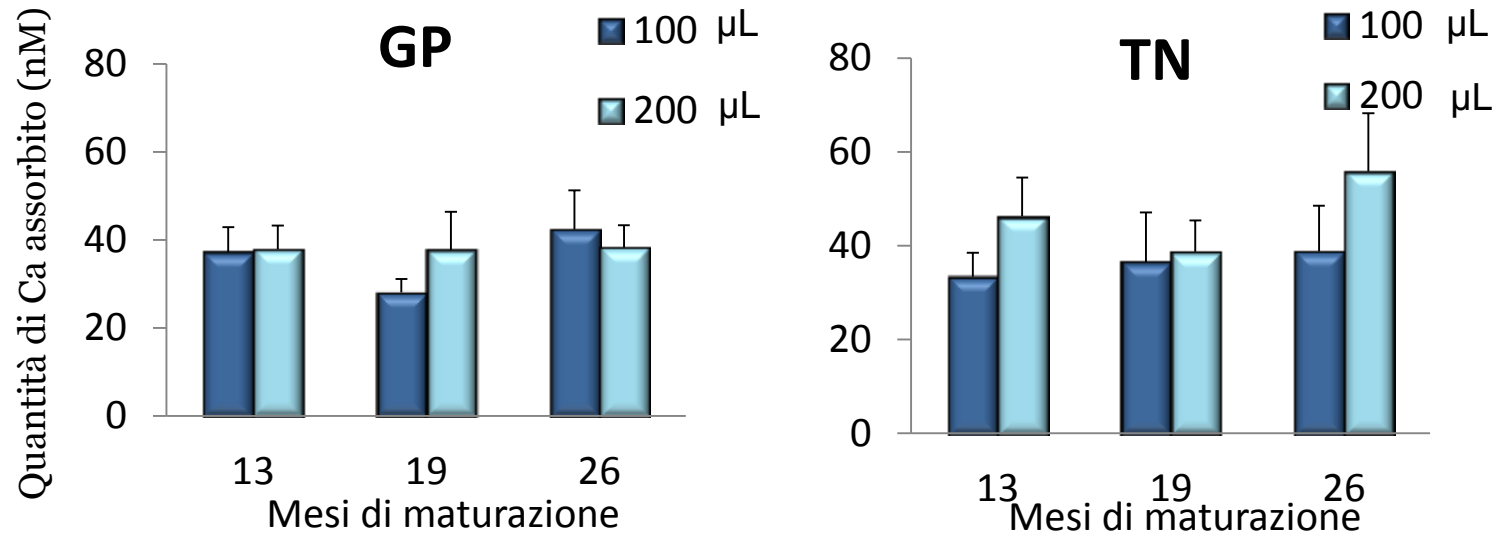


Uptake di Ca *in vitro*

Determinazione della concentrazione citoplasmatica a livello di singola cellula

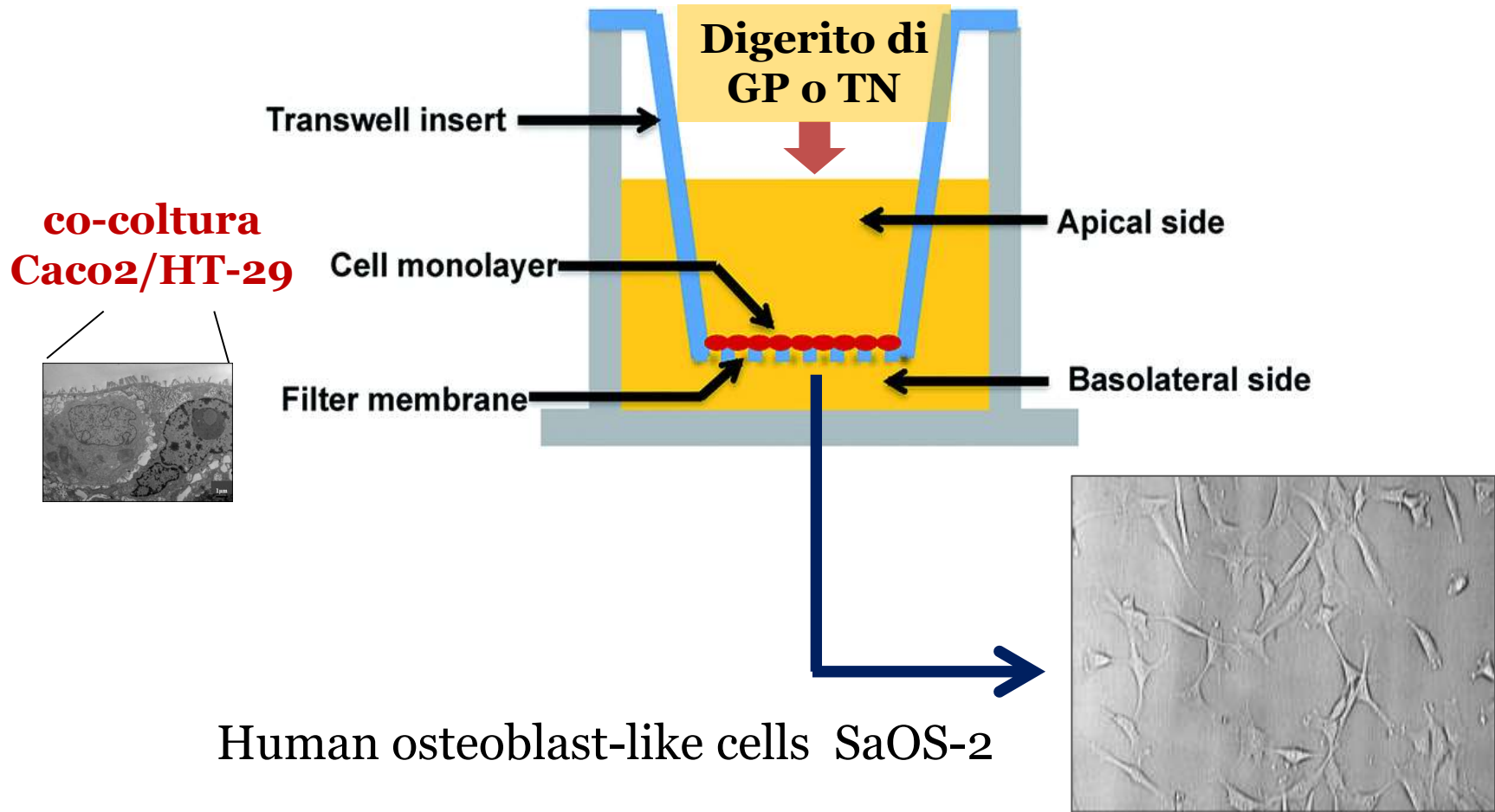


Uptake di Ca *in vitro*



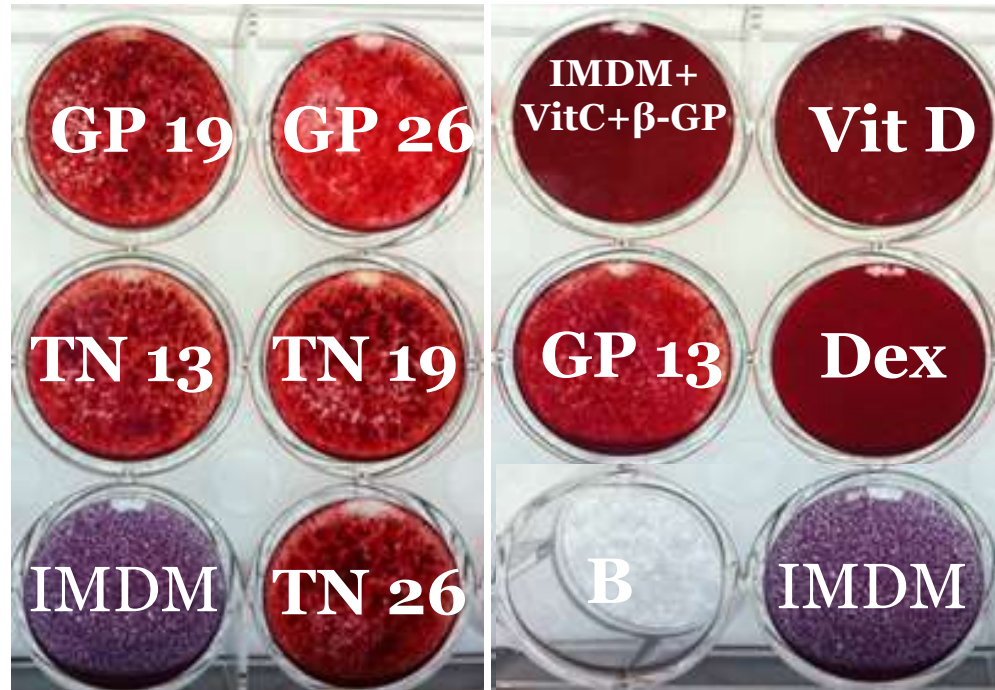
- I digeriti inducono un aumento del livello di Ca nella co-coltura Caco2/HT-29
- L'aumento del livello di Ca intracellulare è:
 - ✓ indipendente dalla dose di digerito
 - ✓ indipendente dal periodo di maturazione del formaggio da cui deriva il digerito

Assorbimento transepiteliale e mineralizzazione ossea *in vitro*



Mineralizzazione ossea *in vitro*

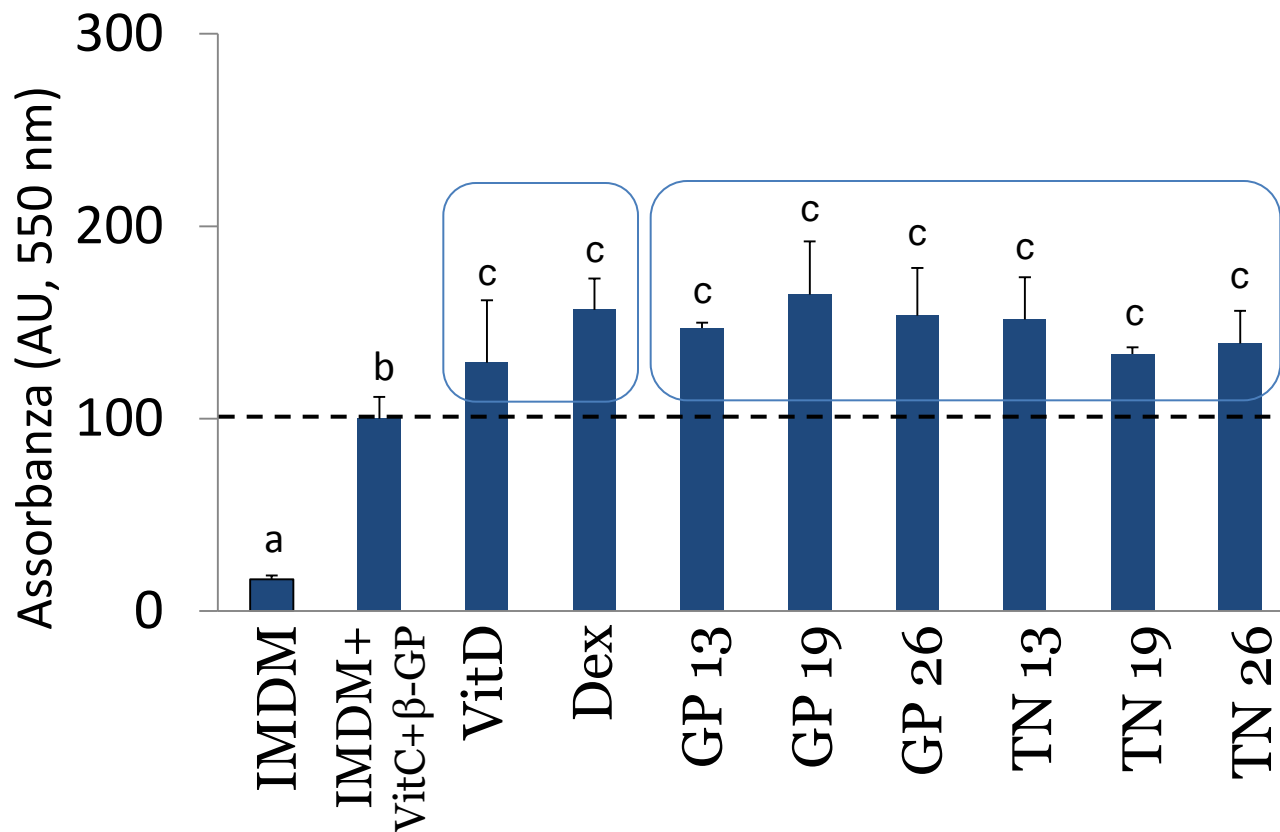
colorazione con Alizarin Red



✓ Tutti i digeriti promuovono la formazione della matrice ossea

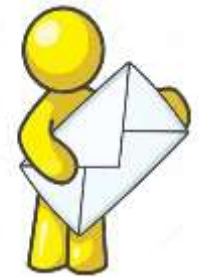
Mineralizzazione ossea *in vitro*

colorazione con Alizarin Red



- ✓ con un effetto paragonabile a quello determinato da “promotori” della mineralizzazione come $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ (VitD) e il Dexamethasone (Dex)
- ✓ La formazione di matrice ossea è indipendente dal periodo di maturazione del formaggio da cui deriva il digerito

Take home messages

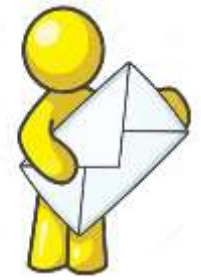


I digeriti di GP e TN:

- Promuovono l'uptake di Ca in un modello (Caco2/HT-29) *in vitro* di epitelio intestinale umano
- inducono la mineralizzazione ossea *in vitro* negli osteoblasti (SaOS-2) umani



Take home messages



Questi fenomeni, simili a quelli verificati in studi *in vitro* con CPP purificati, confermano:

- il ruolo della «matrice latte» nei processi di mineralizzazione ossea
- l'importanza nutrizionale dei prodotti lattiero-caseari





Grazie per l'attenzione!

